

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB  
CURSO DE FARMÁCIA**

FERNANDA INGRYD GOMES MORAES

**Determinação da atividade antimicrobiana e das características físico-químicas  
de extratos de própolis de *Tetragona clavipes* (borá) e *Scaptotrigona  
bipunctata* (tubuna)**

BRASÍLIA, DF

2023

FERNANDA INGRYD GOMES MORAES

**Determinação da atividade antimicrobiana e das características físico-químicas de extratos de própolis de *Tetragona clavipes* (borá) e *Scaptotrigona bipunctata* (tubuna)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

BRASÍLIA, DF

2023

MM828d Moraes, Fernanda Ingrid Gomes  
Determinação da atividade antimicrobiana e das características físico-químicas de extratos de própolis de *Tetragona clavipes* (borá) e *Scaptotrigona bipunctata* (tubuna) / Fernanda Ingrid Gomes Moraes; orientador Daniela Castilho Orsi. -- Brasília, 2023.  
42 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2023.

1. Própolis. 2. Abelhas sem ferrão. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Atividade antioxidante . I. Orsi, Daniela Castilho, orient. II. Título.

FERNANDA INGRYD GOMES MORAES

**Determinação da atividade antimicrobiana e das características físico-químicas  
de extratos de própolis de *Tetragona clavipes* (borá) e *Scaptotrigona  
bipunctata* (tubuna)**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Farmacêutica Esp. Carla Azevedo Bilac  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Farmacêutica Rebeca Dias dos Santos  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2023

## RESUMO

As própolis das abelhas sem ferrão são menos estudadas que as própolis das abelhas europeias (*Apis mellifera*). Assim, os objetivos deste estudo foram determinar a atividade antibacteriana e as características físico-químicas de extratos de própolis (EP) de abelhas sem ferrão nativas do Brasil: tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*) e borá (*Tetragona clavipes*). O EP de tubuna foi obtido em um meliponário no Rio Grande do Sul e o EP de borá em um meliponário no Distrito Federal. A atividade antibacteriana foi verificada por determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e ensaio de difusão em disco. A atividade antioxidante foi avaliada através da redução dos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS). Também foi determinado o teor de compostos fenólicos das amostras. Nos resultados, o EP de borá apresentou halos de inibição de 25,0-30,3 mm para as bactérias *B. cereus*, *S. aureus* e *S. mutans*, enquanto o EP de tubuna não formou halo de inibição bacteriana. Para as bactérias gram-positivas, o EP de borá apresentou menores valores de CIM e CBM (CBM de 0,002 mg/mL para *B. cereus*, 0,08 mg/mL para *S. aureus* e de 0,06 mg/mL para *S. mutans*) em relação ao EP de tubuna (CBM de 0,06 mg/mL para *B. cereus*, 0,50 mg/mL para *S. aureus* e 0,80 mg/mL para *S. mutans*). Para *K. pneumoniae* os EP de tubuna e borá obtiveram mesmo valor de CBM de 0,3 mg/mL. E para *S. enterica* o EP de borá apresentou CBM de 0,2 mg/mL e o EP de tubuna CBM de 0,5 mg/mL. O teor de compostos fenólicos do EP de borá foi de 2,66%, enquanto o EP de tubuna não apresentou compostos fenólicos na metodologia testada. O EP de borá apresentou atividade antioxidante (424,02 mM/mg TEAC para ABTS e 162,53 mM/mg TEAC para DPPH) muito superior ao EP de tubuna (0,54 mM/mg TEAC para ABTS e 0,47 mM/mg TEAC para DPPH). Embora os dois extratos de própolis desse estudo tenham apresentado atividade bactericida, assim como atividade antioxidante, pode-se concluir que o extrato de própolis de borá foi superior ao extrato de própolis de tubuna tanto em atividade antimicrobiana quanto em atividade antioxidante. As própolis produzidas por essas diferentes espécies de abelhas nativas exibem propriedades biológicas diferentes dependendo da localização geográfica onde as abelhas coletam os compostos para produção da própolis.

**Palavras-chave:** abelhas sem ferrão, meliponídeos, própolis, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Stingless bee propolis is less studied than European bee propolis (*Apis mellifera*). Thus, the objectives of this study were to determine the antibacterial activity and physicochemical characteristics of propolis extracts (PE) from stingless bees native to Brazil: tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*) and borá (*Tetragona clavipes*). Tubuna's PE was obtained in Rio Grande do Sul and borá's PE in the Federal District. The antibacterial activity was verified by determining the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and disk diffusion assay. The antioxidant activity was evaluated through the reduction of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radicals. The content of phenolic compounds in the samples was also determined. In the results, the PE from borá showed inhibition halos of 25.0-30.3 mm for the bacteria *B. cereus*, *S. aureus* and *S. mutans*, while the PE from tubuna did not form a bacterial inhibition halo. For gram-positive bacteria, the PE of borá showed lower values of MIC and MBC (MBC of 0.002 mg/mL for *B. cereus*, 0.08 mg/mL for *S. aureus* and 0.06 mg/mL for *S. mutans*) versus tubuna PE (0.06 mg/mL CBM for *B. cereus*, 0.50 mg/mL for *S. aureus* and 0.80 mg/mL for *S. mutans*). For *K. pneumoniae*, the PE from tubuna and borá obtained the same MBC value of 0.3 mg/mL and for *S. enterica* the PE of borá presented CBM of 0.2 mg/mL and the PE of tubuna CBM of 0.5 mg/mL. The content of phenolic compounds in PE from borá was 2.66%, while PE from tubuna did not present phenolic compounds in the tested methodology. Borá PE showed antioxidant activity (424.02 mM/mg TEAC for ABTS and 162.53 mM/mg TEAC for DPPH) much higher than tubuna PE (0.54 mM/mg TEAC for ABTS and 0.47 mM/mg TEAC for DPPH). Although the two propolis extracts in this study showed bactericidal activity, as well as antioxidant activity, it can be concluded that the borá propolis extract was superior to the tubuna propolis extract in both antimicrobial and antioxidant activity. The propolis produced by these different species of native bees exhibit different biological properties depending on the geographic location where the bees collect the compounds for propolis production.

**Keywords:** stingless bees, *Meliponini*, propolis, antimicrobial activity, antioxidant activity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ninho de abelha tubuna.....3
- Figura 2** – Ninho de abelha borá.....4

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Ensaio de disco-difusão dos extratos de própolis.....12
- Tabela 2** – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de própolis.....13
- Tabela 3** – Análises físico-químicas dos extratos de própolis.....15

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABTS</b>	2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BPW</b>	extrato de própolis de borá ( <i>Tetragona clavipes</i> )
<b>Caldo LB</b>	Caldo Luria Bertani
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>EP</b>	extrato de própolis
<b><i>et al.</i></b>	e outros
<b>IN</b>	instrução normativa
<b>TEAC</b>	atividade antioxidante expressa em <i>Trolox</i>
<b>TU</b>	extrato de própolis de tubuna ( <i>Scaptotrigona bipunctata</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
2.1. A meliponicultura no Brasil .....	2
2.2. <i>Scaptotrigona bipunctata</i> e <i>Tetragona clavipes</i> .....	2
2.3. Atividade antimicrobiana e antioxidante das própolis das abelhas sem ferrão .....	4
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
3.1. Objetivo Geral .....	7
3.2. Objetivos específicos .....	7
<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>8</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
5.1. Obtenção dos extratos de própolis .....	9
5.2. Preparo dos inóculos .....	9
5.3. Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis por ensaio de difusão em disco .....	9
5.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis .....	10
5.5. Caracterização físico-química de identidade e qualidade dos extratos de própolis .....	11
5.6. Análises estatísticas .....	11
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>17</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>20</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão, também conhecidas como meliponídeos, são um dos grupos mais abundantes e diversificados em termos de comportamento e morfologia das abelhas e são encontradas nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Recentemente, a produção de mel de abelhas sem ferrão vem crescendo, pois essas abelhas não possuem um comportamento agressivo, quando comparadas com as abelhas europeias (*Apis mellifera*). As abelhas sem ferrão também desempenham um papel significativo no ecossistema, devido ao seu papel polinizador (ISIDOROV *et al.*, 2022; PICCININI *et al.*, 2021; ROZMAN *et al.*, 2022).

No Brasil, a espécie de abelha sem ferrão *Tetragona clavipes*, também conhecida popularmente como borá, derivado do termo "hebora", que no idioma tupi significa "o que há de ter (mel)", é encontrada em quase todo território brasileiro, é caracterizada por população numerosa e de grande interesse para produção de mel (DUARTE, 2012). O orifício de entrada dos ninhos, único para cada colônia é construído com resina endurecida e própolis escura (NOGUEIRA *et al.*, 2022).

A espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata*, conhecida popularmente como tubuna, está presente em três biomas brasileiros (Pampa, Mata Atlântica e Pantanal) (PICCININI *et al.*, 2021) e é produtora de mel e própolis (NISHIO *et al.*, 2016). Os ninhos das abelhas tubuna apresentam como característica marcante, uma única entrada composta por resinas e própolis em forma de funil e todas as fendas dos ninhos são cobertas por própolis (FIANCO *et al.*, 2013).

Como destacam alguns autores:

A própolis é um produto apícola muito utilizado como medicamento, pois exibe muitas propriedades biológicas, incluindo atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. A própolis é uma mistura de cera, saliva de abelha e compostos resinosos que as abelhas coletam da vegetação. Esses compostos respondem pelos efeitos biológicos de própolis. As abelhas produzem própolis porque precisam selar e proteger seus ninhos contra intrusos. Como as abelhas coletam compostos resinosos de diferentes fontes vegetais, existem diversos tipos de própolis, e a atividade da própolis depende de seus constituintes (PAZIN *et al.*, 2017; ROZMAN *et al.*, 2022).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A meliponicultura no Brasil

Os meliponídeos (*Meliponini*) são as espécies de abelhas conhecidas popularmente como abelhas indígenas “sem ferrão”, por possuírem o ferrão atrofiado (vestigial), perdendo a capacidade de ferroar. Os meliponídeos encontram-se distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e no Brasil são registradas 245 espécies de abelhas-sem-ferrão (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2021). A importância dessas abelhas na preservação ambiental é indiscutível, pois são responsáveis pela polinização de 30% das espécies da Caatinga e Pantanal e até 90% das espécies da Mata Atlântica (PEREIRA *et al.*, 2017):

Há séculos a meliponicultura (criação racional das abelhas-sem-ferrão) vem sendo praticada no continente americano. No Brasil, a atividade vem ganhando maior divulgação nos últimos 10 anos, e ao longo desse tempo, vem cativando muitos praticantes. De fácil manejo e sem interferir no tempo a ser dedicado às demais atividades agropecuárias, a meliponicultura é classificada como uma atividade promotora de sustentabilidade. Além do mel, outros produtos das abelhas-sem-ferrão, como própolis, pólen e cera, apresentam grande potencial como alternativa para auxiliar no sustento em pequenas propriedades rurais (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021).

### 2.2. *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes*

A abelha tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*) é uma espécie bem distribuída no território brasileiro, sendo encontrada em Minas Gerais, no Rio Grande do Sul, em São Paulo, no Paraná e em Santa Catarina. A abelha tubuna também é conhecida como abelha canudo devido à entrada de sua colônia ser em formato de funil. Suas colônias são bastante populosas e seus ninhos são encontrados em cavidades pré-existentes em troncos de árvores. Seu corpo apresenta cabeça, tórax e abdômen pretos com aspecto brilhoso e mede 7 milímetros de comprimento (FIANCO *et al.*, 2013; PICCININI *et al.*, 2021) (Figura 1).

**Figura 1** – Ninho de abelha tubuna.



Fonte: BioDiversity4All (2023)

A abelha borá (*Tetragona clavipes*) é encontrada no Acre, no Amazonas, no Amapá, na Bahia, no Espírito Santo, em Goiás, no Maranhão, em Minas Gerais, no Mato Grosso do Sul, no Mato Grosso, no Pará, no Paraná, no Rio de Janeiro e em São Paulo. Seu corpo é alongando e mede por volta de 10 milímetros de comprimento. É muito parecida com a abelha jataí, por isto em certas regiões é chamada de jataizão, por ser maior que a abelha jataí. Suas colônias têm um número muito alto de indivíduos, em média de 7 mil indivíduos. Tem preferência por fazer ninhos em partes ocas de árvores vivas e a entrada da colônia é elíptica na maioria das vezes, parecendo uma fenda (DUARTE, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2022) (Figura 2).

**Figura 2 – Ninho de abelha borá**



**Fonte:** BioDiversity4All (2023)

Os gêneros *Scaptotrigona* e *Tetragona* produzem própolis bruta e de acordo com Villa-Bôas (2018) as etapas de beneficiamento da própolis são equivalentes as das própolis das abelhas *Apis* para a obtenção do extrato de própolis. Sendo assim, pode-se ter como base as diretrizes gerais da IN n° 3/2001 (BRASIL, 2001), onde o extrato de própolis deve ter, no mínimo, 11% de extrato seco, ou seja, 110 gramas de matéria-prima para preparar 1 litro de infusão.

Ainda não há legislação específica para os extratos de própolis das abelhas nativas, porém com base em algumas publicações científicas que já testaram a ação de extratos de própolis de abelhas nativas, é possível afirmar que essa referência de 11% se aplica bem à própolis de abelhas sem ferrão (VILLAS-BÔAS, 2018).

### **2.3. Atividade antimicrobiana e antioxidante das própolis das abelhas sem ferrão**

A investigação de produtos naturais com atividade antimicrobiana tem atraído o interesse de muitos pesquisadores, motivados pelo aumento da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas tradicionais (SFORCIN, 2016). Apesar das própolis das abelhas sem ferrão serem menos estudadas que as própolis das abelhas europeias (*Apis mellifera*), já existem vários estudos na literatura mostrando as atividades biológicas das própolis das abelhas sem ferrão.

Foi reportado por Torres *et al.* (2018), que os extratos de própolis de mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) e jataí (*Tetragonisca angustula*) inibiram o crescimento dos

microrganismos testados (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, e *K. pneumoniae* ATCC 23883), sendo que o extrato de própolis de mandaçaia mostrou atividade antimicrobiana mais forte. Já Santos *et al.* (2017) reportaram que os extratos de própolis de manduri (*Melipona orbignyi*) apresentaram atividade bactericida e fungicida contra todos os microrganismos avaliados (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. neoformans* e *C. albicans*).

Cunha *et al.* (2013) observaram que o extrato de própolis produzido pela abelha uruçú (*Melipona scutellaris*) inibiu o crescimento das bactérias *S. aureus* e *S. mutans* em baixas concentrações, enquanto a inibição das bactérias *E. faecalis* e *Actinomyces naeslundii* necessitaram de concentrações maiores da própolis. O extrato de própolis da abelha uruçú também diminuiu a formação de biofilmes de *S. mutans*, sendo considerado promissor para controlar a formação de biofilmes causados por essa bactéria.

A própolis produzida pela abelha mirim ou jataí amarela (*Tetragonisca fiebrigi*) teve atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Candida glabrata* e *C. albicans*. Foi observada maior atividade contra bactérias gram-positivas do que contra bactérias gram-negativas (Campos *et al.*, 2015). Surek *et al.* (2021) também obtiveram melhores resultados de atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*) em relação a bactérias gram-negativas (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) em testes com extratos de própolis de mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) e tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*).

A oxidação oriunda de processos metabólicos e fisiológicos decorrentes de reações bioquímicas e da cadeia respiratória no nosso organismo produz radicais livres que se apresentam, principalmente, na forma de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A oxidação faz parte do metabolismo celular e, por essa razão, os radicais livres são produzidos naturalmente. Porém, um desequilíbrio a favor destes radicais livres diante dos mecanismos antioxidantes dos sistemas biológicos gera uma condição de estresse oxidativo, que está associado à patogênese de muitas doenças, como câncer, aterosclerose, diabetes mellitus e doenças degenerativas (KUREK-GORECKA *et al.*, 2014).

O crescente interesse de pesquisadores em busca de compostos antioxidantes, incluindo os de origem natural, está relacionado ao efeito benéfico dessas substâncias

para o organismo. Bonamigo *et al.* (2017) relataram que a própolis produzida por mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) e pela abelha canudo (*Scaptotrigona depilis*) exerceram atividade antioxidante nos ensaios de DPPH e ABTS, e protegeram os eritrócitos humanos contra a peroxidação lipídica, sendo este efeito demonstrado por sua atividade anti-hemolítica. Pazin *et al.* (2017) investigaram três própolis de abelhas sem ferrão: mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), borá (*Tetragona clavipes*) e tubi (*Scaptotrigona* spp.), e usando o método de ensaio DPPH, os resultados mostraram que o extrato de própolis de mandaçaia apresentou a maior atividade antioxidante.

A amostra de própolis produzida pela abelha mirim ou jataí amarela (*Tetragonisca fiebrigi*), contendo compostos fenólicos, álcool e terpenos, apresentou atividade antioxidante, evidenciada pela eliminação de radicais livres (ABTS), e inibição da lise de hemácias incubadas com um agente oxidante (CAMPOS *et al.*, 2015). Da mesma forma, a própolis produzida por manduri (*Melipona orbignyi*) também apresentou atividade antioxidante, eliminando radicais livres e inibindo a hemólise e a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos (CAMPOS *et al.*, 2014).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Os objetivos dessa pesquisa foram determinar a atividade antimicrobiana e características físico-químicas de extratos de própolis das abelhas sem ferrão borá (*Tetragona clavipes*) e tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis empregando ensaio de difusão em disco,
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis,
- Determinar as características físico-químicas dos extratos de própolis.

#### 4 JUSTIFICATIVA

Mais de 200 espécies de abelhas sem ferrão habitam o Brasil e a própolis produzida por essas diferentes espécies de abelhas nativas exibe propriedades biológicas diferentes dependendo da localização geográfica onde as abelhas coletam os compostos para produção da própolis (PAZIN *et al.*, 2017). As própolis das abelhas nativas sem ferrão são menos estudadas que as própolis das abelhas europeias (*Apis mellifera*), como por exemplo, a própolis verde brasileira. Assim, este estudo buscou analisar os extratos de própolis das abelhas sem ferrão borá e tubuna obtidos em meliponários do Distrito Federal e Rio Grande do Sul para elucidar melhor as características físico-químicas e atividades antimicrobianas dessas própolis.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Obtenção dos extratos de própolis**

As amostras da própolis foram obtidas em meliponários localizados no Distrito Federal (*Tetragona clavipes*, borá) e Rio Grande do Sul (*Scaptotrigona bipunctata*, tubuna).

### **5.2. Preparo dos inóculos**

Os inóculos utilizados foram cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-17-06, *Salmonella enterica* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de *Mc Farland* ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro.

### **5.3. Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis por ensaio de difusão em disco**

O método de ensaio de difusão em disco foi realizado para as bactérias gram-positivas utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Para realizar o ensaio de difusão em disco, com o auxílio de alça de Drigalsky, o inóculo microbiano foi semeado na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton, até a obtenção de um esfregaço uniforme.

Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro impregnados com 20 µL dos extratos de própolis. Os testes foram realizados em duplicata e as leituras foram realizadas após 24 horas de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos de inibição do crescimento em milímetros de diâmetro.

#### **5.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis**

Foram realizadas diluições em caldo LB das culturas na concentração de 0,5 na escala de *Mc Farland* na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. Os extratos de própolis foram diluídos em caldo LB em diferentes concentrações. Então, adicionou-se em tubos estéreis 0,2 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 0,2 mL das diferentes concentrações de extratos de própolis, resultando em uma concentração final de bactérias de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL.

Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 0,2 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 0,2 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 0,2 mL de caldo LB e 0,2 mL de extrato de própolis. Os testes foram realizados em duplicata.

Os tubos foram incubados a 37°C por 18 horas e então as diluições foram plaqueadas em ágar Müller-Hinton e incubadas a 37°C por 18-24 horas e a CBM foi determinada na menor concentração dos extratos de própolis onde não foram observadas colônias nas placas.

A metodologia para a determinação da CIM foi modificada de acordo com Ristivojević *et al.* (2018). Após o período de incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano, o método colorimétrico da resazurina sódica 0,01% foi utilizado, aplicando-se 20 µL da solução de resazurina em 100 µL de cada teste, para realização da leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracterizou a inatividade bacteriana e a cor rosa o crescimento das bactérias.

Portanto a CIM foi definida como a menor concentração dos extratos de própolis que inibiram o crescimento microbiano e apresentaram cor azul na presença da resazurina. A resazurina é um indicador de óxido-redução usado na avaliação da viabilidade celular. Esse reagente apresenta cor azul e se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas (RISTIVOJEVIĆ *et al.*, 2018).

## **5.5. Caracterização físico-química de identidade e qualidade dos extratos de própolis**

As amostras foram colocadas em cadinhos (previamente secos e pesados) e mantidas em estufa a 105°C até se obter peso constante, sendo determinado o teor de extrato seco (IAL, 2008). Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912). A atividade antioxidante in vitro foi determinada pelos métodos de redução dos radicais: ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) conforme RUFINO et al. (2007a), com modificações e, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), conforme RUFINO et al. (2007b), com modificações.

## **5.6. Análises estatísticas**

Os resultados foram expressos como média de análises em duplicata. O valor de  $p$  calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado e quando as médias foram significativamente diferentes a  $p < 0,05$ , o teste de *Tukey* foi usado para comparação das médias. Os dados foram analisados com uso do software STATISTICA®, versão 10.0.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis por ensaio de difusão em disco para as bactérias gram-positivas. O extrato de própolis de abelha borá apresentou halos de inibição de 25,0-30,3 mm para as bactérias *B. cereus*, *S. aureus* e *S. mutans*.

**TABELA 1. Ensaio de disco-difusão dos extratos de própolis**

Bactérias Gram-positivas	Extratos de própolis	
	BPW	TU
<i>B. cereus</i>	30,3±0,07 a	N
<i>S. aureus</i>	26,2±0,01 b	N
<i>S. mutans</i>	25,0±0,14 b	N

Fonte: Autoria própria. BPW = extrato de própolis de abelha (*Tetragona clavipes*) do Distrito Federal; TU = extrato de própolis de abelha tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*) do Rio Grande do Sul. N = não houve halo de inibição microbiana. Os resultados foram expressos como médias dos diâmetros dos halos (mm) ± desvio padrão de três repetições. As médias na mesma coluna com letras distintas apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Os resultados obtidos para o extrato de própolis de abelha borá, podem ser comparados com estudos que usaram extratos de própolis de abelha *Apis mellifera*. Erturk *et al.* (2016) relataram que o extrato de própolis da Turquia apresentou halo de inibição de 16 mm para *S. aureus* ATCC 6538, 15 mm para *B. cereus* ATCC 11778 e 20 mm para *S. mutans* RSHE 676. Nascimento *et al.* (2018) observaram que a atividade antibacteriana dos extratos de própolis marrom e vermelho, utilizando técnica de disco-difusão, mostraram halos de inibição de 16-25 mm para *S. aureus* ATCC 25923.

No presente estudo, o extrato de própolis de abelha tubuna não apresentou halo de inibição para as bactérias testadas. Resultados similares foram reportados por Santos (2023), onde os 2 extratos de própolis de abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) testados não formaram halo de inibição bacteriana.

A tabela 2 apresenta os resultados de CIM e CBM dos extratos de própolis. Para as bactérias gram-positivas, o extrato de própolis de abelha Borá apresentou menores valores de CIM e CBM em relação ao extrato de própolis de abelha Tubuna.

**TABELA 2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de própolis**

Cepas	Extratos de própolis			
	BPW		TU	
	CIM mg/mL	CBM mg/mL	CIM mg/mL	CBM mg/mL
<b>Bactérias Gram-positivas</b>				
<i>B. cereus</i>	<0,001 a	0,002 b	0,06 c	0,06 c
<i>S. aureus</i>	0,003 a	0,08 b	0,20 c	0,50 d
<i>S. mutans</i>	0,007 a	0,06 b	0,20 c	0,80 d
<b>Bactérias Gram-negativas</b>				
<i>E. coli</i>	0,10 a	0,30 b	0,15 c	0,30 b
<i>K. pneumoniae</i>	0,20 a	0,30 b	0,20 a	0,30 b
<i>S. enterica</i>	0,15 a	0,20 b	0,15 a	0,50 c
<i>P. aeruginosa</i>	<0,05 a	0,25 b	0,10 c	0,30 d

Fonte: Autoria própria. BPW = extrato de própolis de abelha borá (*Tetragona clavipes*) do Distrito Federal; TU = extrato de própolis de abelha tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*) do Rio Grande do Sul. O valor de *p* calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

Isidorov *et al.* (2022) analisaram o extrato de própolis de abelha borá (*Tetragona clavipes*) proveniente da Argentina e reportaram valores de CIM de 0,03 mg/mL para *S. aureus*, 0,13 para *E. coli* e 0,50 mg/mL para *P. aeruginosa*. E os valores de CBM foram de 0,13 mg/mL para *S. aureus*, 0,50 para *E. coli* e >2,00 mg/mL para *P. aeruginosa*. Surek *et al.* (2022) reportaram valores de CIM para *S. aureus* maiores que 1,00 mg/mL para o extrato de própolis de abelha tubuna proveniente do estado do Paraná, enquanto os extratos de própolis das abelhas sem ferrão mandaçaia e mirim apresentaram CIM de 0,25 mg/mL para *S. aureus*.

Assim, os estudos da literatura também encontraram maior atividade antimicrobiana para o extrato de própolis de abelha borá em comparação com o extrato de própolis de abelha tubuna. Surek *et al.* (2022) reportaram que as amostras de própolis de tubuna, mandaçaia e mirim apresentaram diversas e complexas composições químicas e, que além da fonte botânica das própolis, as espécies de abelhas foram possíveis fatores determinantes da atividade antimicrobiana.

Outra importante observação no nosso estudo é que para o extrato de própolis de abelha borá, os valores de CIM e CBM das bactérias gram-positivas foram menores quando comparados aos valores das bactérias gram-negativas. Surek *et al.* (2022) relataram que nenhum dos extratos de própolis avaliados (tubuna, mandaçaia e mirim) foi eficaz contra as bactérias gram-negativas avaliadas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*), com valores CIM > 1,0 mg/mL. Enquanto os extratos de própolis de mandaçaia e mirim apresentaram efeito antibacteriano contra as bactérias gram-positivas testadas (*S. aureus* e *E. faecalis*). Esses resultados estão de acordo com os relatados na literatura, que demonstram que extratos de própolis tanto de abelhas europeias quanto de abelhas sem ferrão têm maior atividade contra bactérias gram-positivas do que gram-negativas (PRZYBYŁEK e KARPINSKI, 2019).

A tabela 3 apresenta as análises de extrato seco, compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos de própolis. A quantificação do extrato seco consiste na porcentagem seca de sólidos dissolvidos nos extratos de própolis, sendo um dos parâmetros de qualidade estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis, com um valor mínimo de 11% (m/v) (BRASIL, 2001). A concentração de extrato seco de 11% indica que o extrato foi elaborado com no mínimo 30% (p/v) de própolis *in natura*. A porcentagem de extrato seco das amostras deste estudo variou de 24,07 a 29,56% e, portanto, se enquadraram nos parâmetros da legislação.

No presente estudo, o teor de compostos fenólicos do extrato de própolis de abelha borá foi de 2,66%, enquanto o extrato de própolis de abelha tubuna não apresentou compostos fenólicos na metodologia testada. Resultados similares foram reportados por Santos (2023), onde os 2 extratos de própolis de abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) testados não apresentaram compostos fenólicos. Pazin *et al.* (2017) reportaram valor de compostos fenólicos de 1,25% para o extrato de própolis de abelha borá proveniente do estado de São Paulo. Piccinini *et al.* (2021) observaram

valor de 0,95% de compostos fenólicos no extrato de própolis de abelha tubuna proveniente da cidade de Gravataí – Rio Grande do Sul.

**TABELA 3. Análises físico-químicas dos extratos de própolis**

Análises	Extratos de própolis	
	BPW	TU
<b>Extrato Seco (% m/v)</b>	29,56±0,27	24,07±0,14
<b>Compostos Fenólicos (% m/m)</b>	2,66±0,01	N
<b>TEAC<sub>ABTS</sub> (mM/mg)</b>	424,02±12,73 a	0,54±0,03 b
<b>TEAC<sub>DPPH</sub> (mM/mg)</b>	162,53±36,41 a	0,47±0,12 b

Fonte: Autoria própria. BPW = extrato de própolis de abelha borá (*Tetragona clavipes*) do Distrito Federal; TU = extrato de própolis de abelha tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*) do Rio Grande do Sul. N = não foi possível realizar método de quantificação. Atividade antioxidante em equivalente em Trolox (TEAC), expressa em milimolar por miligrama de amostra (mM/mg). Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata ± desvio padrão. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  de acordo com o teste de *Tukey*.

No presente estudo, o extrato de própolis de abelha borá apresentou atividade antioxidante (424,02 mM/mg TEAC para ABTS e 162,53 mM/mg TEAC para DPPH) muito superior ao extrato de própolis de abelha tubuna (0,54 mM/mg TEAC para ABTS e 0,47 mM/mg TEAC para DPPH). Resultados similares foram reportados por Santos (2023), onde os 2 extratos de própolis de abelha jataí apresentaram menor atividade antioxidante quando comparadas aos extratos de própolis de abelha mandaçaia. Assim, Santos (2023) relatou que o extrato de própolis de mandaçaia do Rio Grande do Sul obteve concentração de compostos fenólicos (2,56%) e atividade antioxidante (148,20 mM/mg para ABTS e 71,28 mM/mg para DPPH), e tais resultados foram parecidos com o extrato de própolis de abelha borá. Muitos estudos apresentaram uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de própolis (ANDRADE *et al.*, 2017; BITTENCOURT *et al.*, 2015; CASTRO e SALGUEIRO, 2016).

## **7 CONCLUSÃO**

Embora os dois extratos de própolis desse estudo tenham apresentado atividade bactericida, assim como atividade antioxidante, pode-se concluir que o extrato de própolis de borá foi superior ao extrato de própolis de tubuna tanto em atividade antimicrobiana quanto em atividade antioxidante. As própolis produzidas por essas diferentes espécies de abelhas nativas exibem propriedades biológicas diferentes dependendo da localização geográfica onde as abelhas coletam os compostos para a produção das própolis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. K. S. *et al.* Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.

BITTENCOURT, M. L. F. *et al.* Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, n. 76, p.449-457, 2015.

BONAMIGO, T. *et al.* Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 1-12, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**. Brasília, 2001.

CAMPOS, J. F. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 186-296, 2015.

CAMPOS, J. F. *et al.* Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374-380, 2014.

CASTRO, R. N.; SALGUEIRO, F. B. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p.1192-1199, 2016.

CUNHA, M. G. *et al.* Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, p.1- 9, 2013.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard, Eleventh Edition. CLSI document M02-A1, Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

DUARTE, R.S. **Biological aspects intended for beekeeping of *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) (Apidae, Meliponini)**, 2012 82f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ERTURK, O. et al. An *in vitro* study on antimicrobial and antioxidant activity of propolis from Rize province of Turkey, **Mellifera**, v.16, n. 1, p. 4–18, 2016.

FIANCO, A. L. B. et al. Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna), **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 21, p. 01-112, 2013.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. XII, p. 239-243, 1912.

IAL, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 1. ed. digital São Paulo: IMESP, 2008. Disponível em: [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)

ISIDOROV, V. A. et al. Chemical composition and biological activity of Argentinian propolis of four species of stingless bees. **Molecules**, v. 27, n. 22, p. 7686. 2022.

KUREK-GÓRECKA, A. et al. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 78-101, 2014.

NASCIMENTO, T. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p.246-254, 2018.

NISHIO, E. K. et al. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* (LEPELETIER, 1836), and *S. postica* (LATREILLE, 1807). **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 2164, 2016.

NOGUEIRA, D.S. et al. Revision of the *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) speciesgroup (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Zootaxa**, v. 5119, n. 1, p. 1-64, 2022.

OLIVEIRA, F. F. et al. **Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tefé: IDSM, 267 p., 2013.

PAZIN, W. M. et al. Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. **Journal of Apicultural Research**, p. 1-10, 2017.

PRZYBYŁEK, I.; KARPINSKI, T.M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, p. 2047–2064, 2019.

PEREIRA, F. de M.; SOUZA, B. de A.; LOPES, M. T. do R. **Criação de abelhas-sem-ferrão**. Folhetos, Embrapa Meio-Norte, 2017.

PICCININI, A. et al. Bioactive compounds and antiradical activity of propolis from *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona depilis*. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v.4, n.6, p. 28084-28092, 2021.

RISTIVOJEVIĆ, P. *et al.* Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities, **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 367–379, 2018.

ROZMAN, A. S. *et al.* A comprehensive review of stingless bee products: phytochemical composition and beneficial properties of honey, propolis, and pollen. **Applied Sciences**, v. 12, n. 13, p. 6370, 2022.

RUFINO, M. do S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007a.

RUFINO, M. do S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007b.

SANTOS, R. D. **Determinação das características físico-químicas e microbiológicas das própolis de jataí e mandaçaia.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, 2023.

SANTOS, C. F. *et al.* Diversidade de abelhas sem ferrão e seu uso como recurso natural no Brasil: permissões e restrições legais consorciadas a políticas públicas. **Revista brasileira de meio ambiente**, v. 9, n. 2, p. 02–22, 2021.

SANTOS, H. *et al.* Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 953, 2017.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

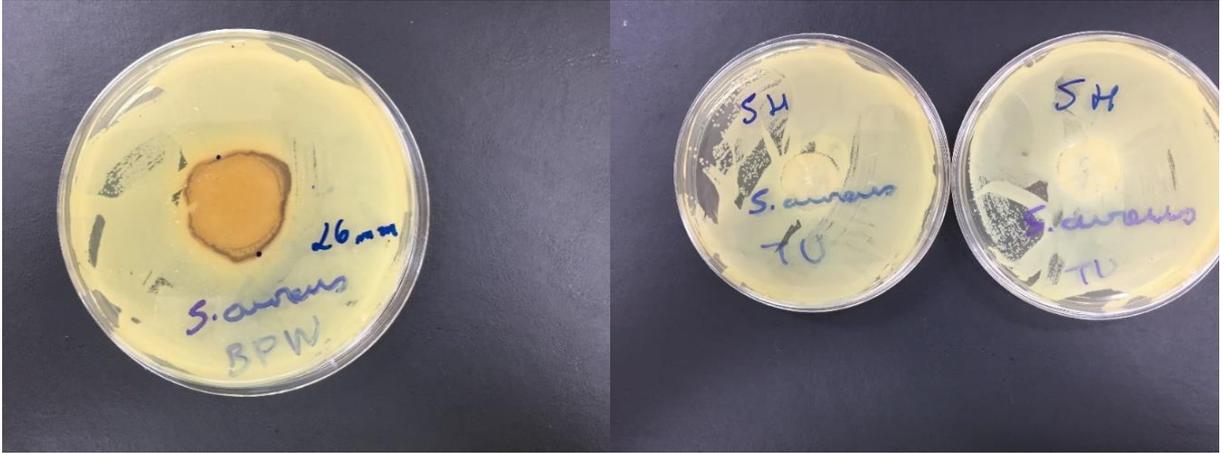
SUREK, M. *et al.* Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different *Meliponini* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113662, 2021.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual tecnológico de aproveitamento integral dos produtos das abelhas nativas sem ferrão.** 2. ed. Brasília, DF: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2018.

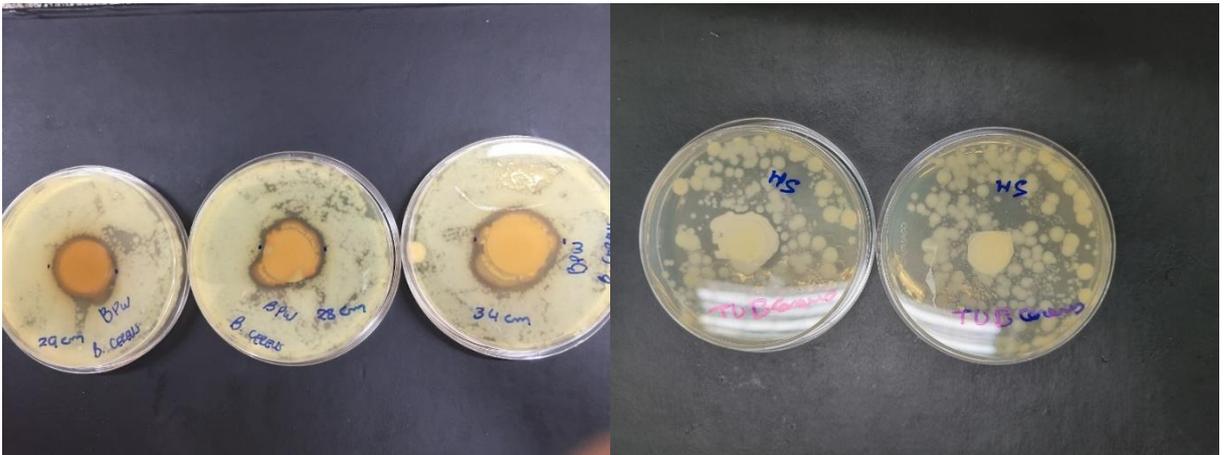
TORRES, A. R. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, p. 1–10, 2018.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco



ANEXO 1.1 – Imagens das placas com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco

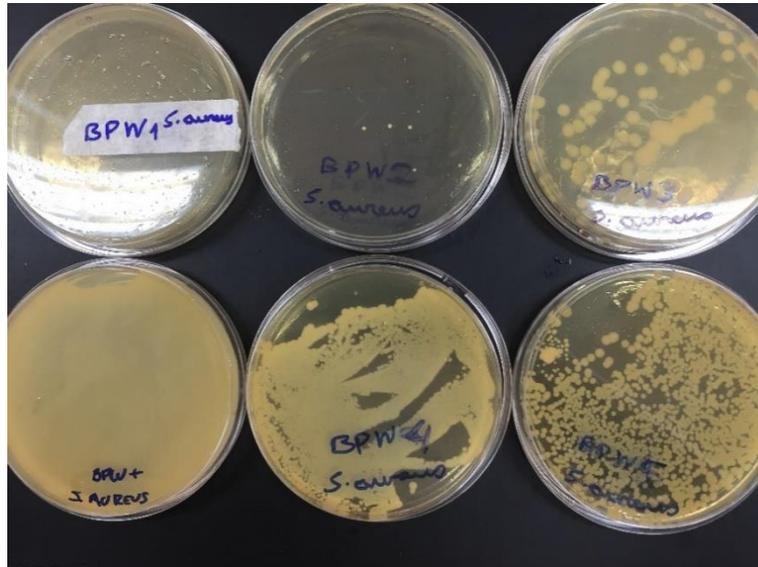


ANEXO 1.2 – Imagens das placas com *Bacillus cereus* ATCC 14579 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco dos extratos de própolis



**ANEXO 1.3 – Imagens das placas com *Streptococcus mutans* ATCC 25175 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco dos extratos de própolis**

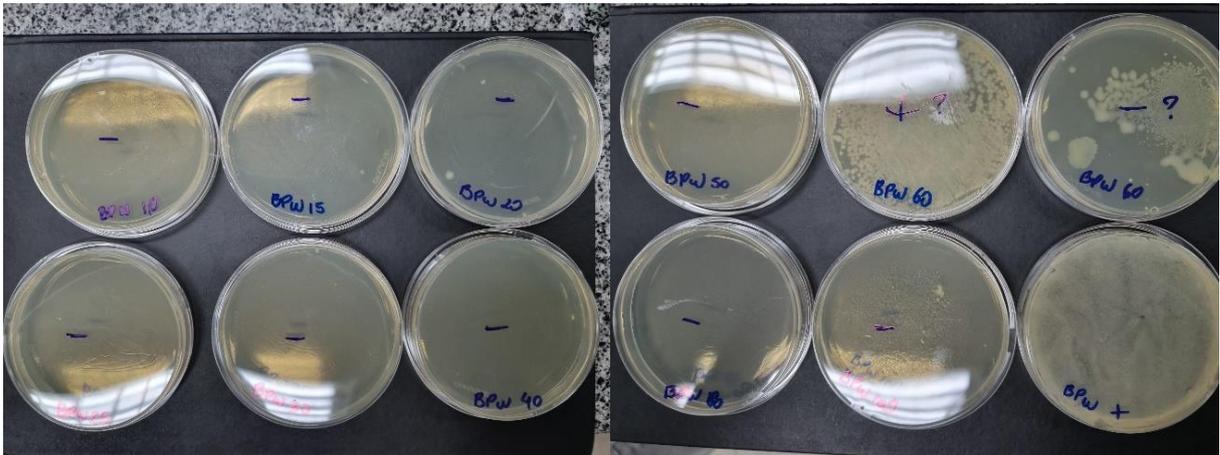
## ANEXO 2 – CBM das bactérias Gram-positivas



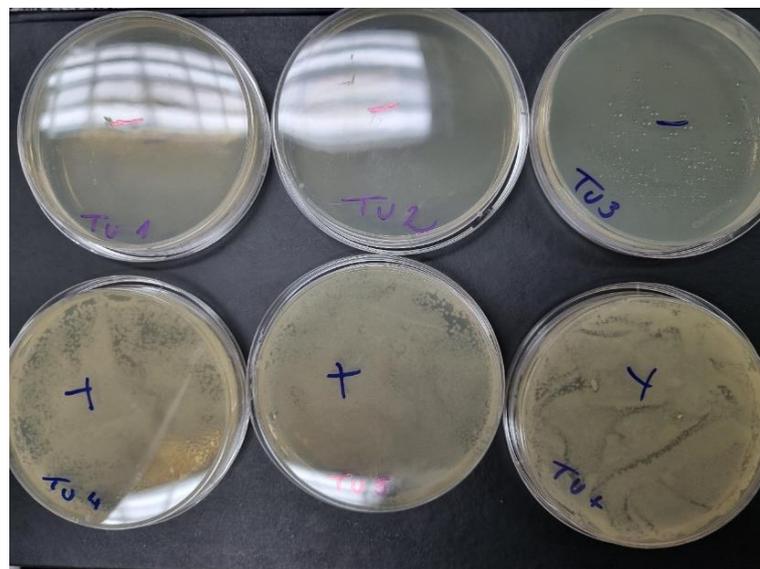
ANEXO 2.1 – Imagem das placas com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 1- 0,10 mg/mL; 2- 0,08 mg/mL; 3- 0,06 mg/mL; 4- 0,05 mg/mL; 5- 0,03 mg/mL; (+) = controle positivo



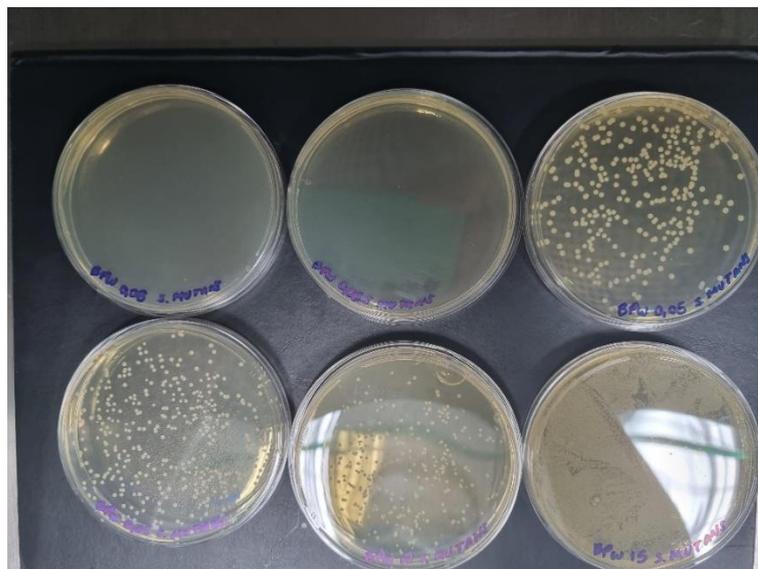
ANEXO 2.2 – Imagem das placas com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,20 mg/mL; 5- 0,10 mg/mL; (+) = controle positivo



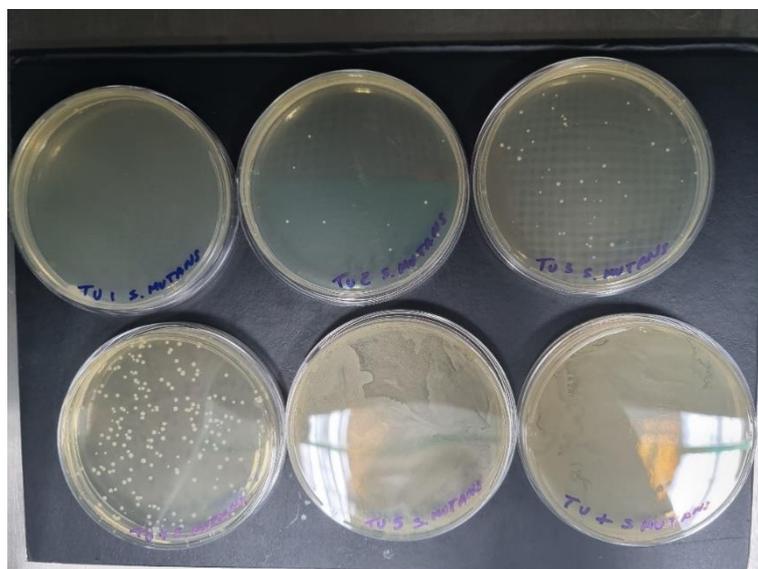
**ANEXO 2.3 – Imagem das placas com *Bacillus cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 1- 10 $\mu$ g/mL; 2- 7 $\mu$ g/mL; 3- 5 $\mu$ g/mL; 4- 4 $\mu$ g/mL; 5- 3  $\mu$ g/mL; 6- 2,5  $\mu$ g/mL; 7- 2  $\mu$ g/mL; 8- 1,5  $\mu$ g/mL; 9- 1,25  $\mu$ g/mL; 10- 1  $\mu$ g/mL; (+) = controle positivo**



**ANEXO 2.4 – Imagem das placas com *Bacillus cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,06 mg/mL; 4- 0,03 mg/mL; 5- 0,02 mg/mL; (+) = controle positivo**

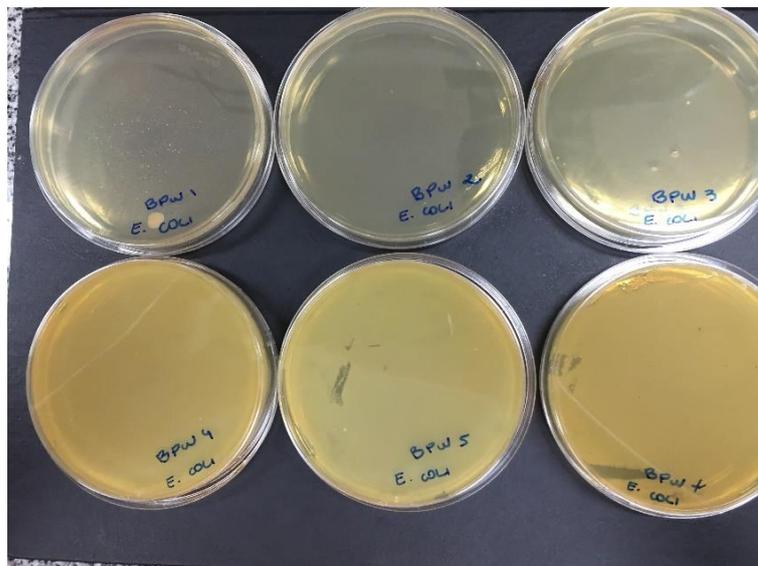


**ANEXO 2.5 – Imagem das placas com *Streptococcus mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 1- 0,08 mg/mL; 2- 0,06 mg/mL; 3- 0,05 mg/mL; 4- 0,03 mg/mL, (+) = controle positivo.**

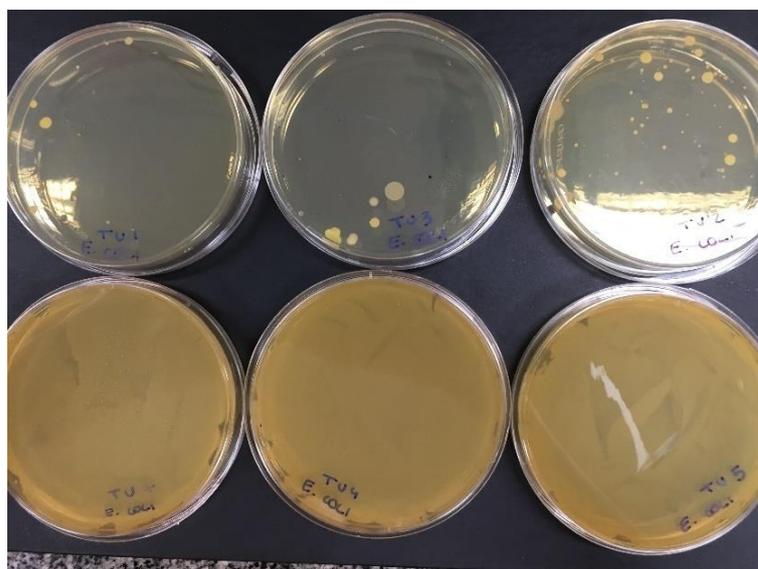


**ANEXO 2.6 – Imagem das placas com *Streptococcus mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,20 mg/mL; 5- 0,10 mg/mL; (+) = controle positivo.**

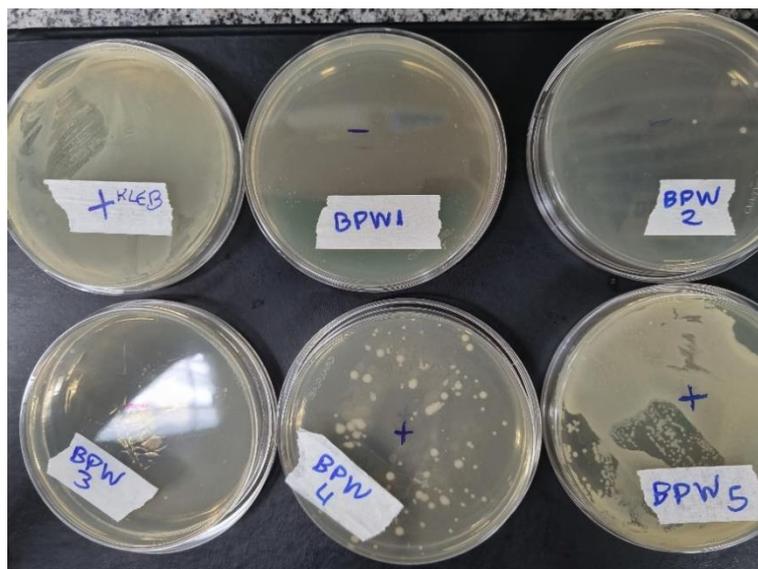
### ANEXO 3 – CBM das bactérias Gram-negativas



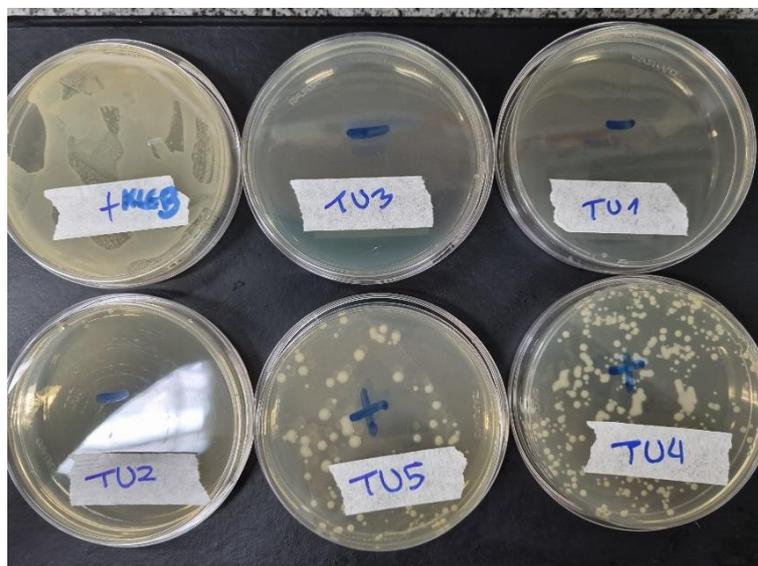
ANEXO 3.1 – Imagem das placas com *Escherichia coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,05 mg/mL; 5- 0,025 mg/mL; (+) = controle positivo



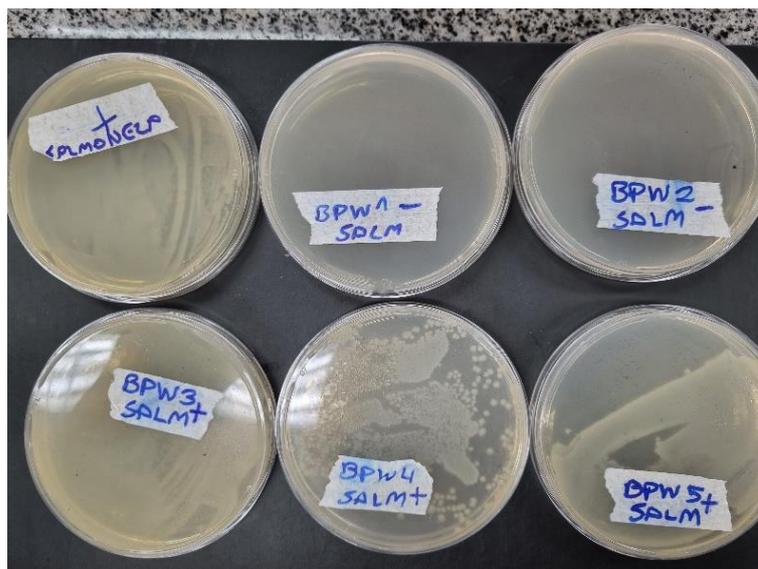
ANEXO 3.2 – Imagem das placas com *Escherichia coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,05 mg/mL; 5- 0,025 mg/mL; (+) = controle positivo



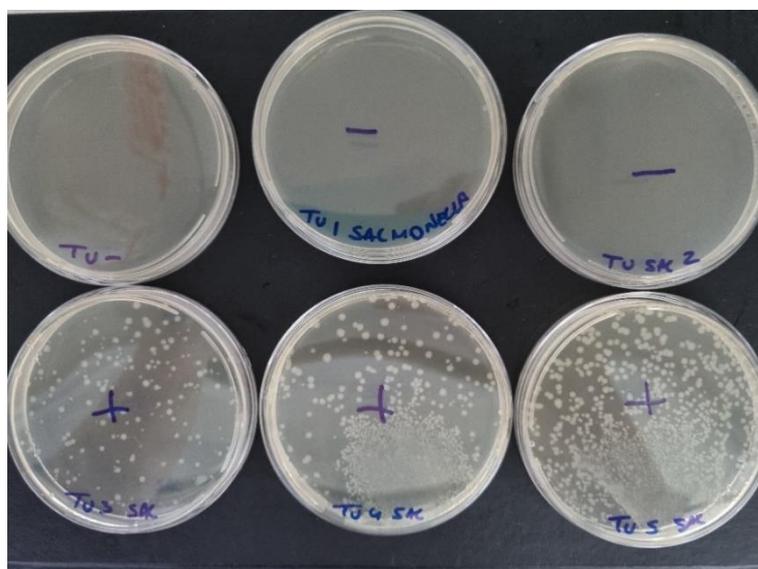
**ANEXO 3.3 – Imagem das placas com *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,25 mg/mL; 5- 0,20 mg/mL; (+) = controle positivo**



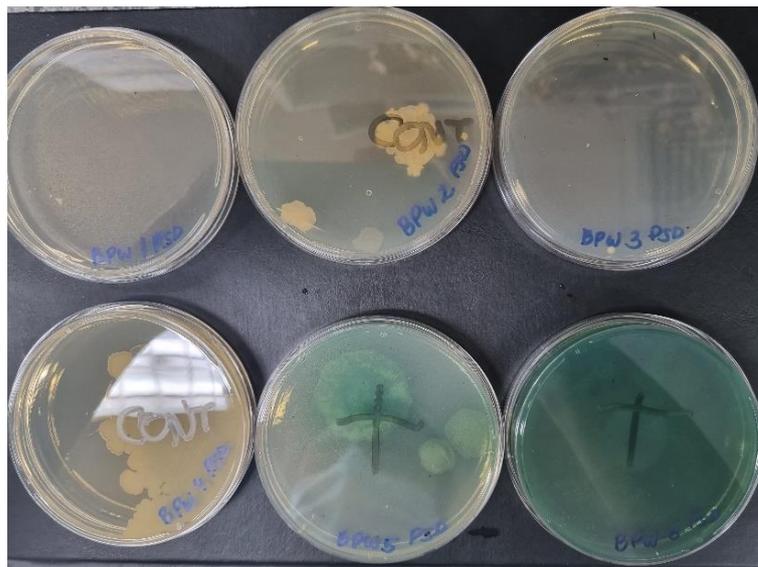
**ANEXO 3.4 – Imagem das placas com *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,25 mg/mL; 5- 0,20 mg/mL; (+) = controle positivo**



**ANEXO 3.5 – Imagem das placas com *Salmonella enterica* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 1- 0,30mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,05 mg/mL**



**ANEXO 3.6 – Imagem das placas com *Salmonella enterica* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,25 mg/mL; 5- 0,20 mg/mL**

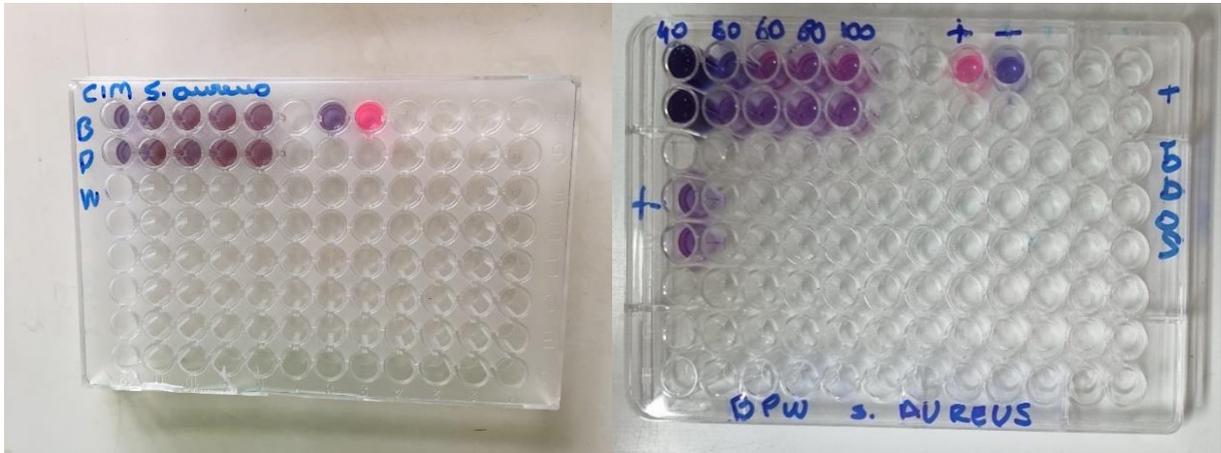


**ANEXO 3.7 – Imagem das placas com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,25 mg/mL; 5- 0,20 mg/mL**

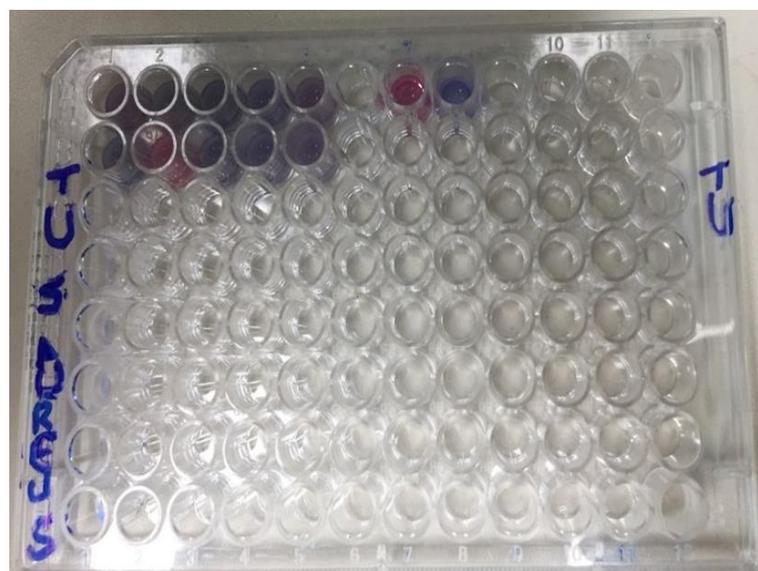


**ANEXO 3.8 – Imagem das placas com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 1- 0,80 mg/mL; 2- 0,50 mg/mL; 3- 0,30 mg/mL; 4- 0,25 mg/mL; 5- 0,20 mg/mL**

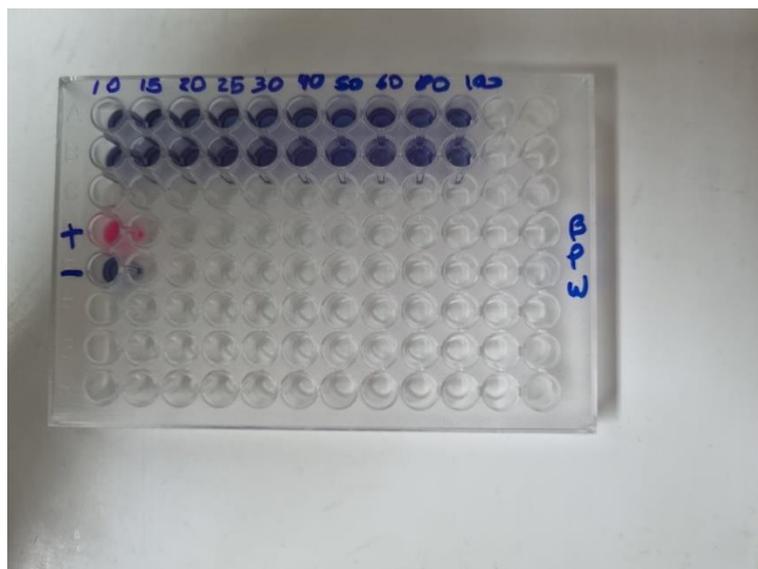
**ANEXO 4 –** Imagens da determinação de CIM em microplacas utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular. Cor azul = morte celular e cor rosa fluorescente = resazurina reduzida a resorufina pelas enzimas óxido-reduzases presentes nas células vivas



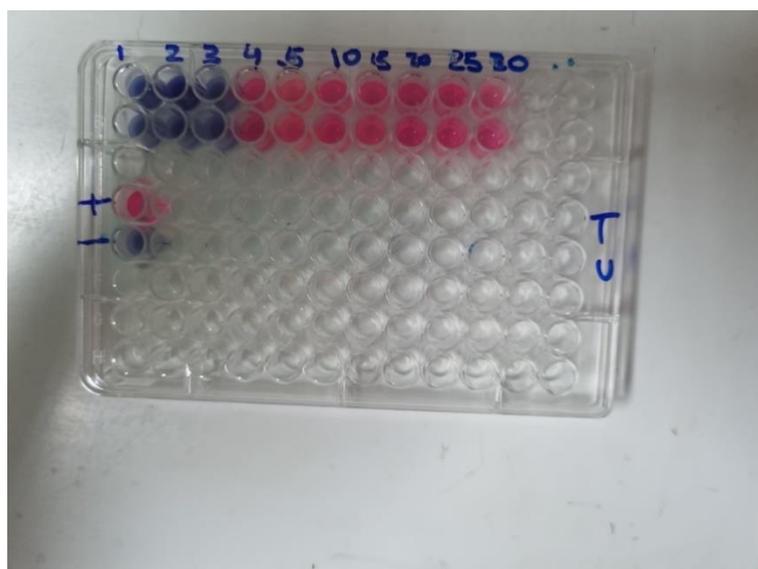
**ANEXO 4.1 –** CIM de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 0,03; 0,02; 0,007; 0,005; 0,003; 0,0025; 0,002; 0,0015; 0,00125; 0,001 mg/mL



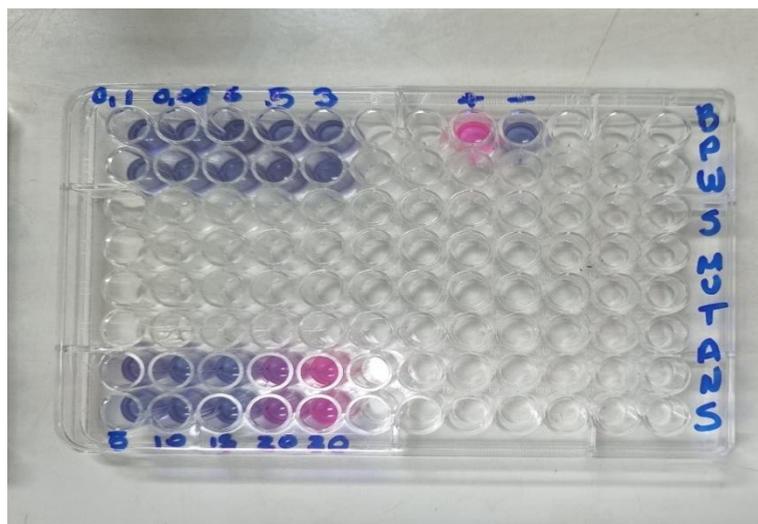
**ANEXO 4.2 –** CIM de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 mg/mL



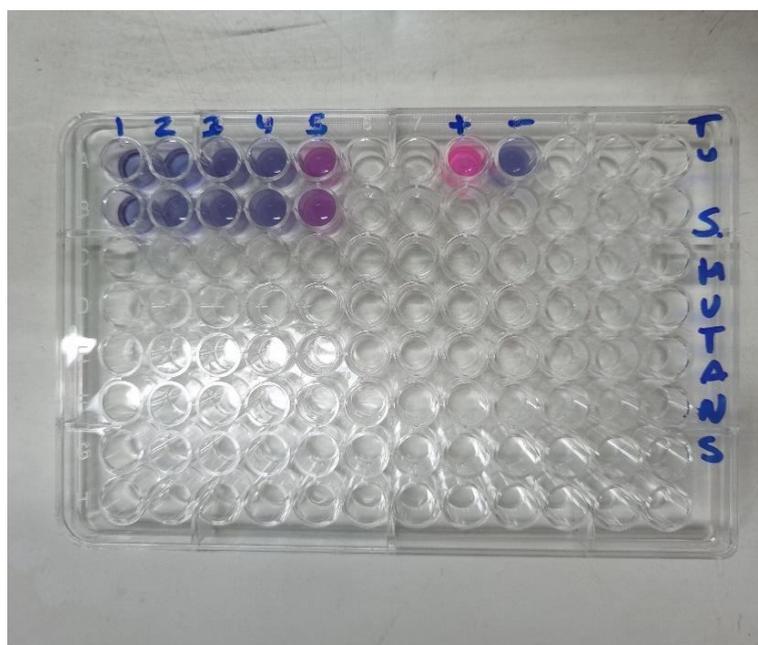
**ANEXO 4.3 – CIM de *Bacillus cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 0,01; 0,007; 0,005; 0,004; 0,003; 0,0025; 0,002; 0,0015; 0,00125; 0,001 mg/mL**



**ANEXO 4.4 – CIM de *Bacillus cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 0,15; 0,10; 0,06; 0,03; 0,02; 0,01; 0,007; 0,005; 0,004; 0,003 mg/mL**



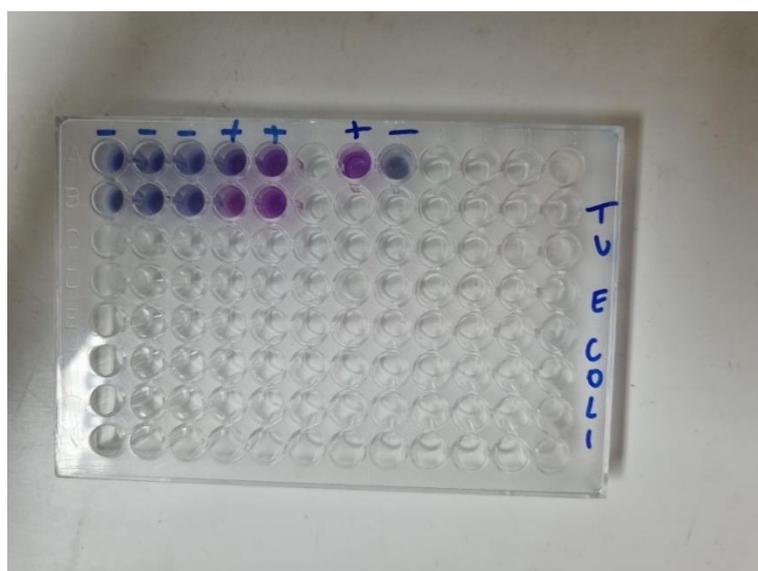
**ANEXO 4.5 – CIM de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 0,1; 0,08; 0,06; 0,05; 0,03; 0,02; 0,01; 0,007; 0,005; 0,003 mg/mL**



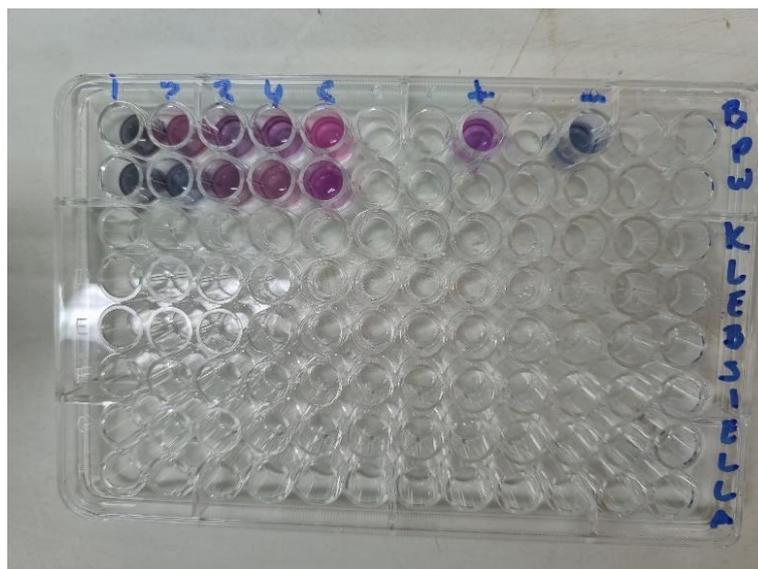
**ANEXO 4.6 – CIM de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 mg/mL**



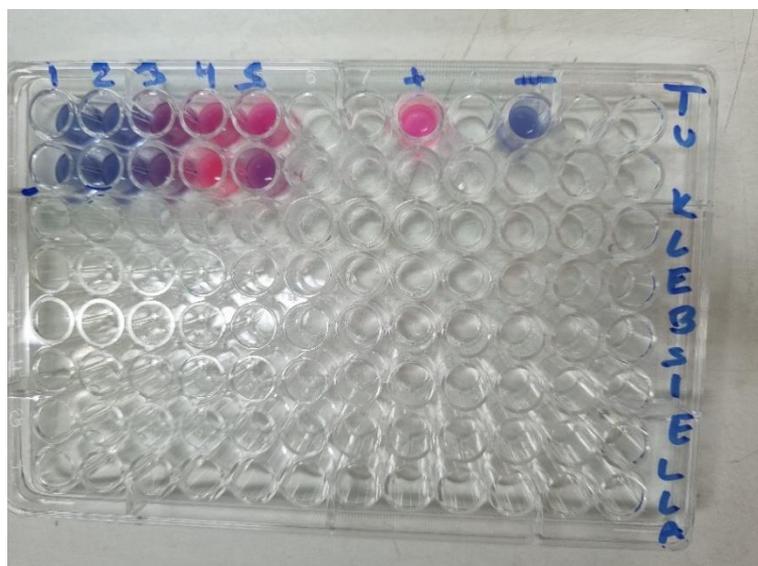
**ANEXO 4.7 – CIM de *Escherichia coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 0,1; 0,08; 0,06; 0,05; 0,03 mg/mL**



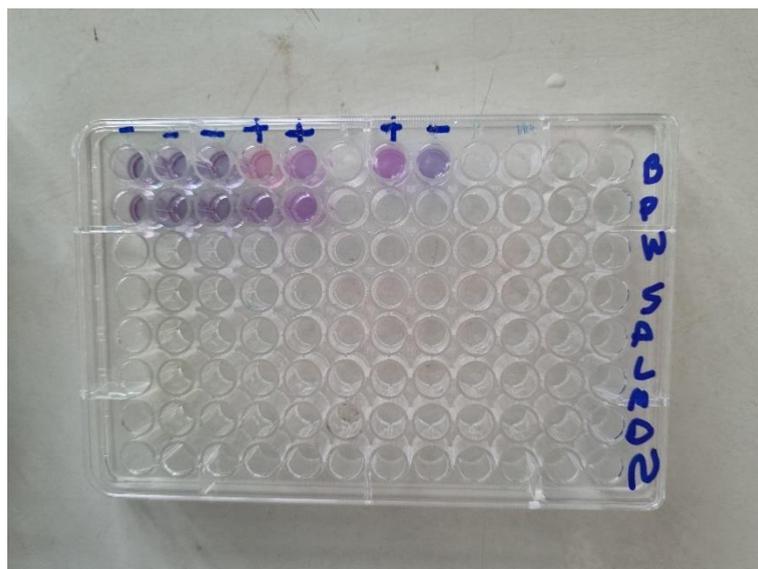
**ANEXO 4.8 – CIM de *Escherichia coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 0,3; 0,2; 0,15; 0,10; 0,05 mg/mL**



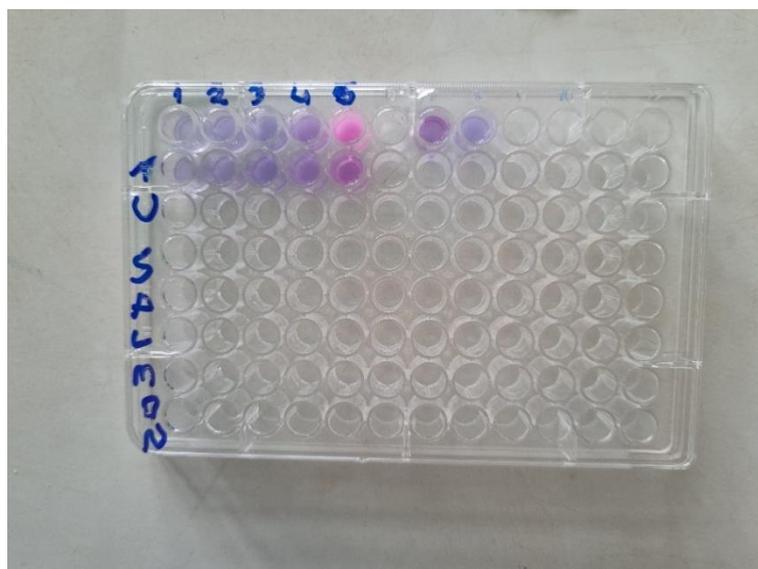
**ANEXO 4.9 – CIM de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 0,3; 0,2; 0,15; 0,10; 0,05 mg/mL**



**ANEXO 4.10 – CIM de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 0,3; 0,2; 0,15; 0,10; 0,05 mg/mL**



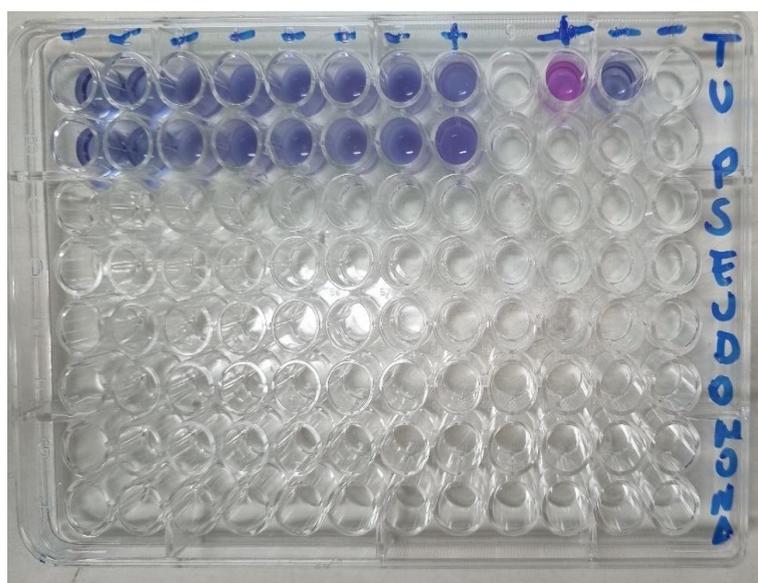
**ANEXO 4.11 – CIM de *Salmonella enterica* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 0,3; 0,2; 0,15; 0,10; 0,05 mg/mL**



**ANEXO 4.12 – CIM de *Salmonella enterica* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 0,3; 0,2; 0,15; 0,10; 0,05 mg/mL**



**ANEXO 4.13 – CIM de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis BPW: 0,3; 0,2; 0,15; 0,10; 0,05 mg/mL**



**ANEXO 4.14 – CIM de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis TU: 0,3; 0,2; 0,15; 0,10; 0,05 mg/mL**

## ANEXO 5 – Determinação de compostos fenólicos

### Curva Padrão

10mg(ácido tânico) → 100ml

↓

0,2 ml (0,02 mg)

X      —————      0,4 ml (0,04 mg)

0,6 ml (0,06 mg)

0,8 ml (0,08 mg)

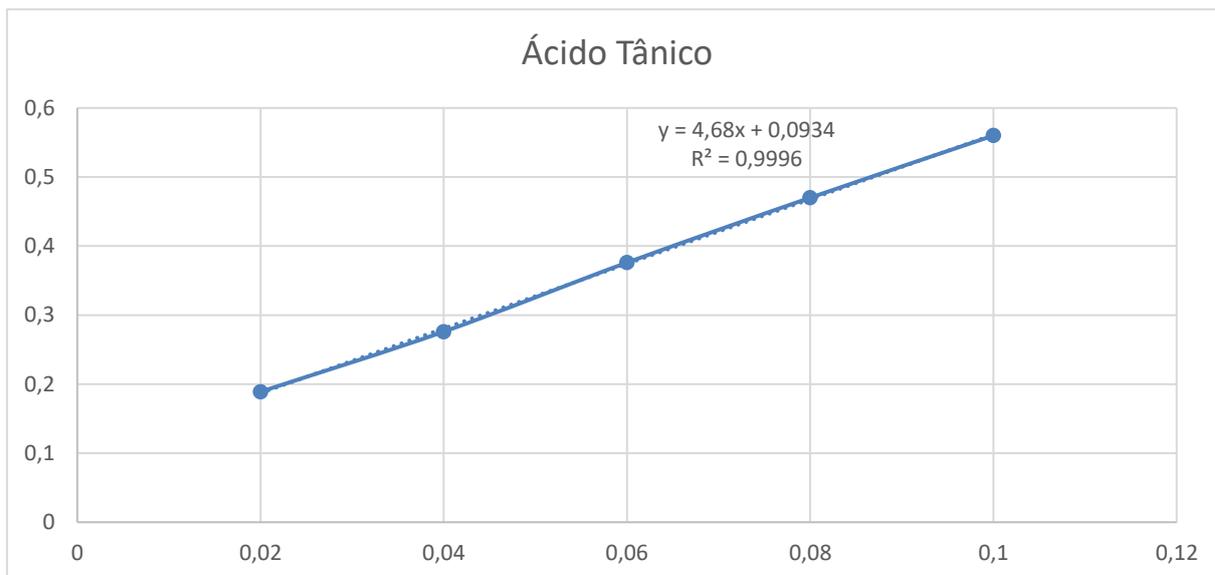
1,0 ml (0,10 mg)

Ex: 10 mg -----100 ml

X      ----- 0,2 ml

X = 0,02 mg

Concentração (mg)	Absorbância ácido tânico
0,02	0,189
0,04	0,276
0,06	0,376
0,08	0,470
0,10	0,560



## BPW

0,2 mL --- 50 mL

$$0,4 - 0,253/0,285$$

$$0,6 - 0,378/0,409 = 2,53 \text{ e } 2,81\%$$

$$0,8 - 0,494/0,490 = 2,67 \text{ e } 2,65\%$$

$$y = 4,68x + 0,0934$$

$$0,378 = 4,68x + 0,0934$$

$$0,378 - 0,0934/4,68$$

0,0608 mg

0,4 ml ----- 50 ml ----- x (5,06 mg)



0,6 ml ----- 0,0608 mg

0,2 ml própolis ----- 5,06 mg FENOLICOS

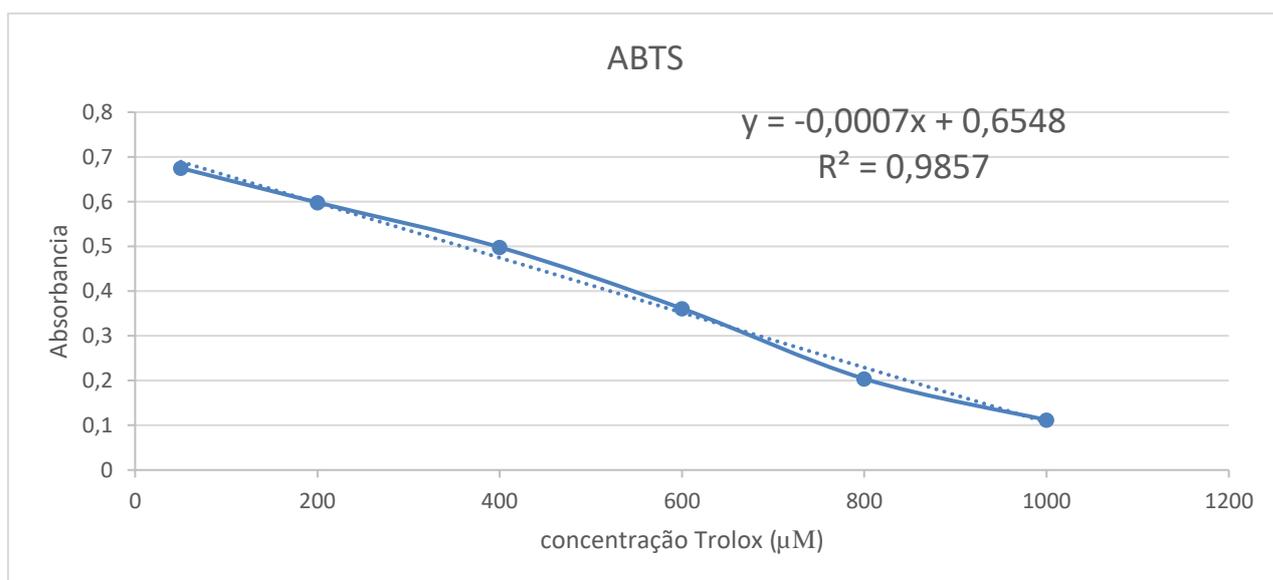
100 g ----- x

X = 2530 mg fenólicos/100 g de própolis (dividir 1000) = 2,53 %

## ANEXO 6 – Determinação de antioxidantes (ABTS)

### Curva padrão de ABTS - Concentração Trolox ( $\mu\text{M}$ )

	Absorbância	Concentração Trolox ( $\mu\text{M}$ )
1	0,675	50
2	0,598	200
3	0,498	400
4	0,361	600
5	0,204	800
6	0,112	1000



**BPW (1:800)** 0,205 = 514,05mM/mg TEAC

**BPW (1:1000)** 0,421 = 334,0mM/mg TEAC

$$Y = - 0,0007x + 0,6548$$

$$0,205 = - 0,0007x + 0,6548$$

$$0,0007x = 0,6548 - 0,205$$

$X = 642,57 \mu\text{mol de Trolox equivalente} \cdot \text{g}^{-1}$  de hidrolisado proteico (Trolox EQ  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )

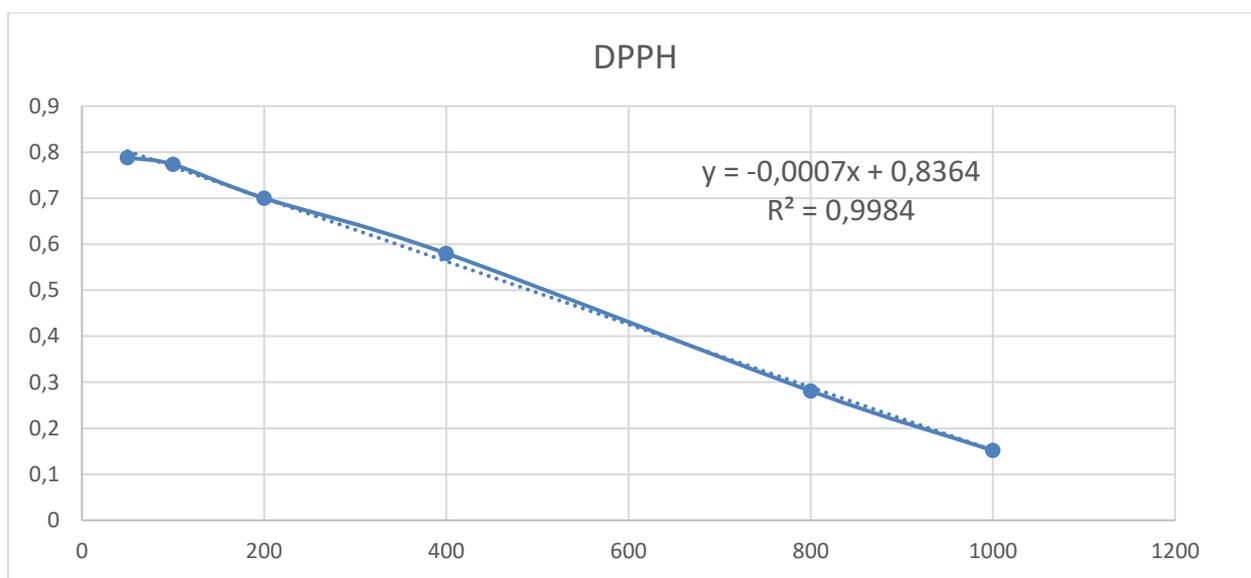
Cálculo de diluição:

$642,57 \times 800 = 514.057,14$  Trolox EQ  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  (divide por 1000) = 514,05 mM/mg  
TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

## ANEXO 7 – Determinação de antioxidantes (DPPH)

### Curva padrão de DPPH

	Absorbância	Concentração Trolox ( $\mu\text{M}$ )
1	0,788	50
2	0,773	100
3	0,700	200
4	0,580	400
5	0,281	800
6	0,152	1000



$$\text{BPW (1:400)} = 0,507 = 188,28$$

$$\text{BPW (1:500)} = 0,645 = 136,78$$

$$Y = -0,0007x + 0,8364$$

$$0,645 = -0,0007x + 0,8364$$

$$0,0007x = 0,8365 - 0,645$$

$$X = 273,57 \mu\text{mol de Trolox equivalente} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ de própolis (Trolox EQ } \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1})$$

Cálculo de diluição:

$273,57 \times 500 = 136.785,71$  Trolox EQ  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (divide por 1000) = 136,78 mM/mg  
TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)